屎肠球菌 WEI-10 对断奶仔猪的安全性评价

冯媛媛;乔琳;姚宏明;介琳霞;高长斌;刘蕊

（北京大伟嘉生物技术股份有限公司，微生态制剂关键技术开发北京市工程实验室，北京市饲用微生态制剂工程技术研究中心，北京 100085）

摘　要：本试验在饲粮中添加屎肠球菌（*Enterococcus faecium*）WEI-10，通过对断奶仔猪活跃状态、腹泻分数、生长性能、菌血症以及组织病理学的检测，评价菌株 WEI-10 对断奶仔猪的安全性。设计 2 批试验，每批选取 26 日龄的断奶仔猪 253 头，平均体重分别为(7.44±1.02)和(8.11±1.51) kg，每批试验分为 2 组：对照组饲喂基础饲粮（不添加抗生素和益生菌），试验组饲喂在添加基础饲粮中添加菌株 WEI-10 的试验饲粮（2 批试验的试验组每克基础饲粮中添加量分别为 1×10^8 CFU 和 1×10^7 CFU）。每批试验 38 d。结果表明：1）2 批试验的试验组与对照组，在活跃分数、平均日增重和料重比上均无显著性差异（P>0.05）。2）试验组在第 5、10 和 38 天腹泻分数均显著性低于对照组（P<0.05）；第 38 天，试验组的腹泻分数降为 0，对照组腹泻分数在 0.6 左右。3）2 批试验的试验组和对照组均未出现菌血症以及心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、十二指肠和空肠的病理学改变。由此可见，菌株 WEI-10 对断奶仔猪不存在安全问题，并且可以减少腹泻。

关键词：屎肠球菌；断奶仔猪；安全性；生长性能；菌血症；组织病理学

中图分类号：S816.7;S828

肠球菌是人类和动物肠道正常菌群的一部分，既往认为肠球菌是对人类和动物无公害的共栖菌，但近年来研究证实肠球菌属的部分种属的菌株对人和动物有致病力，并且这些菌株引发的感染病例数量也在不断上升，已成为医院感染的常见条件致病菌，此外，越来越多的研究证实屎肠球菌（*Enterococcus faecium*）与临床上的一些病理学有关系，如菌血症、不定期心内膜炎和脓肿[1]。尽管，过去几十年益生菌的安全性评价是重要的研究热点，目前对屎肠球菌的安全性评价研究主要通过体外试验，如溶血性、毒力基因、抗生素抗性和产有毒代谢产物等；但是，很多情况下体外安全性评价的结果往往不能真实反映其体内的效果，而目前对体内的安全性评价的研究很少且不系统，并且至今仍没有益生菌体内安全性评价的标准和指南。目前食品用益生菌的临床前体内安全性评价包括急性毒性和亚慢性毒性试验，其

中亚慢性毒性试验的检测指标主要有动物活跃状态、腹泻分数（毒性临床症状）和生长性能等[2-3]，并且很多研究者也将这些指标用于安全性评价研究[4-5]。细菌易位是益生菌安全性评价又一被推荐使用的指标[6-7]，因为它是很多内源性条件致病菌发病的第一步。肝脏、脾脏肿大和其他脏器的实质性病变是反映感染性和致病性的间接指标，肠道黏膜的完整性在阻止潜在致病菌或有毒物质侵袭全身组织上发挥重要的屏障作用，因而也作为安全性评价指标使用[8]。目前无论文献报道结果还是市场实践，均显示益生菌针对畜禽发挥益生功效的日常添加量为每克基础饲粮添加 10^6 CFU 的活性菌[9-10]，本研究选择添加量为日常添加量 10 倍和 100 倍的剂量在断奶仔猪基础饲粮中添加本实验室分离的一株屎肠球菌 WEI-10，通过仔猪活跃状态、腹泻分数、生长性能、菌血症以及组织病理学研究，对菌株 WEI-10 进行系统的针对断奶仔猪的体内安全性评价研究，旨在评价饲用屎肠球菌的体内安全性。

1 材料与方法

1.1 菌株

本试验使用的菌株为屎肠球菌 WEI-10(中国普通微生物菌种保藏管理中心编号 7746)，该菌株分离于 60 日龄健康仔猪肠道黏膜，已进行体外安全性和有效性评价研究[11]和针对小白鼠的急性毒性及亚急性毒性评价试验[3]。体外安全性试验表明，菌株 WEI-10 具有 γ-溶血性、无胆汁盐水解酶活性、不产生物胺（组胺、酪胺和腐胺）、不含欧洲食品安全局(European Food Safety Authority,EFSA)在 2012 年制订的针对屎肠球菌毒力因素评价的规程[12]中要求检测的 3 个毒力基因（即 *IS16*、*esp* 和 hyl_{EFM}）、不含可转移的抗生素抗性基因；小白鼠的急性毒性和亚急性毒性评价试验表明，无论采用原始发酵液（活菌数为 3×10^9 CFU/mL）还是原菌粉（活菌数为 3×10^{10} CFU/g）对小白鼠进行急性毒性和亚急性毒性试验，整个试验过程小白鼠均无死亡，与对照组相比没有出现体重降低，并在皮毛色泽，活跃状态，采食量及肝脏、脾脏、肺脏和肾脏器官指数上与对照组相比没有显著性差异（$P>0.05$），组织病理结果表明肝脏、脾脏、肺脏和肾脏也均无实质性病变。本研究使用的样品为本实验室生产的制粒菌粉，活菌数≥2×10^{10} CFU/g。

1.2 试验动物和试验设计

试验场地位于黑龙江省哈尔滨市某养殖公司的规模猪场。试验采用单因素完全随机试验设计，共设计了 2 批试验，第 1 批试验选择体况相近、健康、平均体重为(7.44±1.02) kg 的

26 日龄断奶仔猪（长白×大白×杜洛克三元杂交）253 头，根据体重相近，公母比例基本一致的原则，随机分为 2 组：对照组 I 饲喂基础饲粮（不添加抗生素和益生菌），试验组 I 饲喂基础饲粮中添加菌株 WEI-10（每克基础饲粮中菌株 WEI-10 的添加量为 1×10^8 CFU）的试验饲粮，每组 6 个重复，每个重复(22±4)头仔猪，每个重复 1 栏。第 2 批试验选择体况相近、健康、平均体重为（8.11±1.51） kg 的 26 日龄断奶仔猪（长白×大白×杜洛克三元杂交）253 头，根据体重相近，公母比例基本一致的原则，随机分为 2 组：对照组 II 饲喂基础饲粮（不添加抗生素和益生菌），试验组 II 饲喂基础饲粮中添加菌株 WEI-10（每克基础饲粮中菌株 WEI-10 的添加量为 1×10^7 CFU）的试验饲粮，每组 6 个重复，每个重复（22±4）头仔猪，每个重复 1 栏。2 批试验均为 38 d。基础饲粮配方营养要求不低于 NRC（2012）推荐的最低标准[13]，其组成及营养水平见表 1。根据猪场条件，为了保证试验结果的可靠性，设计 2 个独立批次试验，分别评价 2 个剂量的安全性。

表 1　基础饲粮组成及营养水平（风干基础）

Table 1　Composition and nutrient levels of basal diets (air-dry basis)　　%

项目 Items	含量 Content		
	体重<10 kg <10 kg of body weight	体重 10~20 kg 10 to 20 kg of body weight	体重 20~50 kg 20 to 50 kg of body weight
原料 Ingredients			
玉米 Corn	46.00	54.00	62.00
豆粕 Soybean meal	30.00	22.00	15.00
麦麸 Wheat bran	16.00	16.00	15.00
鱼粉 Fish meal	6.00	6.00	6.00
预混料 Premix[1)]	1.50	1.50	1.50
食盐 NaCl	0.50	0.50	0.50
合计 Total	100.00	100.00	100.00
营养水平 Nutrient levels[2)]			
干物质 Dry matter	90.20	90.25	90.40
有机质 Organic matter	91.27	91.66	92.37
粗蛋白质 Crude protein	23.22	20.99	18.59
粗脂肪 Ether extract	2.39	3.09	3.80
粗纤维 Crude fibre	4.31	4.55	4.72
粗灰分 Ash	8.73	8.34	7.63
无氮浸出物 Nitrogen-free extract	61.35	63.03	65.26
钙 Ca	0.82	0.71	0.62
磷 P	0.63	0.61	0.55
代谢能 ME/(MJ/kg)	17.41	17.41	17.46

[1)] 每千克预混料含 One kg premix contained the following：VA 2 000 000 IU，VD_3 400 000 IU，VB_2 0.8 g，

VE 0.3 g，VB_{12} 2.4 mg，泛酸钙 calcium pantothenate 0.1 mg，烟酸 niacin 4 g，氯化胆碱 choline chloride 60 g，Ca (as calcium bicarbonate and light calcium carbonate) 0.28 g，Mn (as manganese sulfate) 11 g，I (as potassium iodide) 0.4 g，Fe (as ferrous sulfate) 3 g，Zn (as zinc sulfate) 6 g，Cu (as copper sulfate) 0.8 g，Co 0.18 g，P 80 g。

2)代谢能为计算值，其余为实测值。ME was a calculated value and others were measured values.

1.3 饲养管理

试验组和对照组在相同环境和管理条件下饲养，自由采食，自由饮水，试验期间按照猪场正常程序注射疫苗和驱虫。每天以重复为单位详细记录每头猪的活跃分数（activity score,AS），采用三标度法[5]，1：懒，移动缓慢；2：中间状态；3：活跃移动并觅食。并以重复为单位计算每天的活跃分数平均值，试验结束统计分析全期试验组和对照组的活跃分数。每天记录每头猪的死淘和发病情况。在试验的第 3、5、10、17、24 和 38 天，以重复为单位记录每头猪的腹泻分数（0：球团；1：半球团；2：软便；3：水便）[14-15]，并以重复为单位计算腹泻分数平均值。

1.4 测定指标及方法

1.4.1 生长性能

以重复为单位，计录全程采食量，在试验的第 1 天和第 38 天进行空腹称重，并计算平均日增重、平均日采食量和料重比。同时，试验结束计算全期活跃分数和死淘率。

1.4.2 菌血症

菌血症分析采用文献[4-5]中的方法。试验第 1、10、24 和 38 天时，每个重复随机选择 1 头猪，通过前腔静脉无菌采血 2 mL 于加有柠檬酸钠抗凝剂的采血管中，取 100 μL 血液涂布于 MRS 琼脂平板，于 37 ℃条件下培养 48 h，观察 MRS 琼脂平板有无菌落长出，每份血液样品做 3 个重复。若试验组和对照组检测平板均未长菌落，则认为是菌血症阴性；若有疑似屎肠球菌的菌落长出，则先与对照组平板比较，若对照组平板也有相同菌落，并且通过 16S rRNA 基因序列分析，鉴定属于同一种属，则认为是野生菌株感染，同样判定结果为阴性；若对照组检测平板未长菌落，试验组检测平板有屎肠球菌菌落，则认为是菌株 WEI-10 感染，结果判定为阳性。

1.4.3 脏器指数

从各重复选取 1 头接近平均体重的仔猪，采取直接刺杀心脏放血致死后，立即剖开腹腔，取其心脏、肝脏、脾脏、肺脏和肾脏，剔除脂肪后称取湿重，计算脏器指数。

脏器指数（g/kg）=器官湿重（g）/猪活体重（kg）。

1.4.4　组织病理检查

结扎胃肠段后，于十二指肠和空肠的近端分别截取 2 cm 长肠段，剪取的心脏、肝脏、脾脏、肺脏和肾脏样品各 2 块，浸于 10%甲醛固定，用梯度乙醇逐级脱水，二甲苯洗涤，石蜡包埋，分别在十二指肠和空肠肠段的 3~6 个位点，连续切取 3~6 个肠环横断面，分别在剪取的每块心脏、肝脏、脾脏、肺脏和肾脏样品的 3 个位点，连续切取 3 个横断面或纵断面，制备 6 μm 厚石蜡切片，苏木精-伊红（HE）染色，光学显微镜下观察肠组织和各脏器的基本形态和病理学改变，并用图像采集系统采集相应组织图像。

1.5　数据分析

试验数据均用平均值±标准差表示，采用 SPSS 16.0 统计软件中的 one-way ANOVA 进行单因素方差分析，以 $P<0.05$ 为差异显著。

2　结　果

2.1　屎肠球菌 WEI-10 对断奶仔猪活跃状态的影响

活跃状态用活跃分数表示，试验全期，2 个批次试验的活跃分数如图 1 所示，第 1 批试验，对照组Ⅰ和试验组Ⅰ的活跃分数分别是 2.22 和 2.15；第 2 批试验，对照组Ⅱ和试验组Ⅱ的活跃分数分别是 2.30 和 2.35，活跃分数均处于中间状态和活跃移动并觅食之间。2 批试验的试验组和对照组在活跃状态上无显著性差异（$P>0.05$），且对照组和试验组均未发生死亡或疾病。

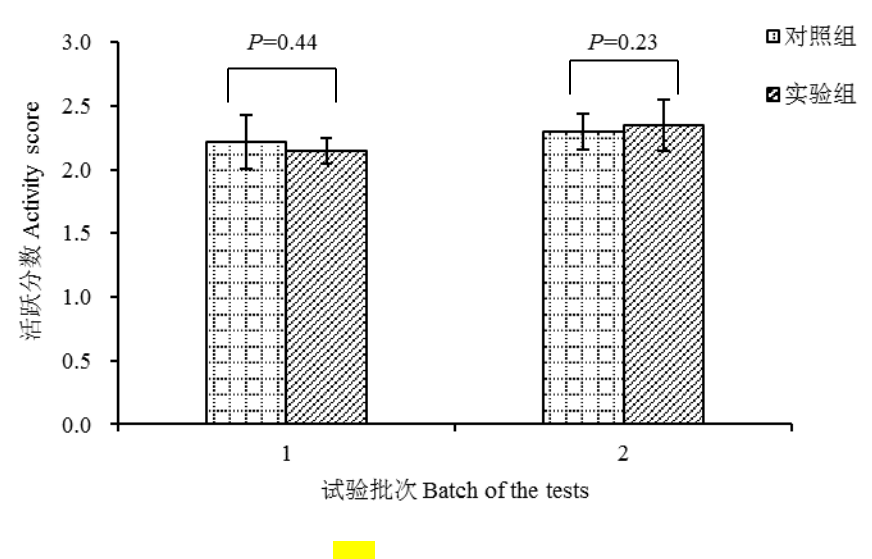
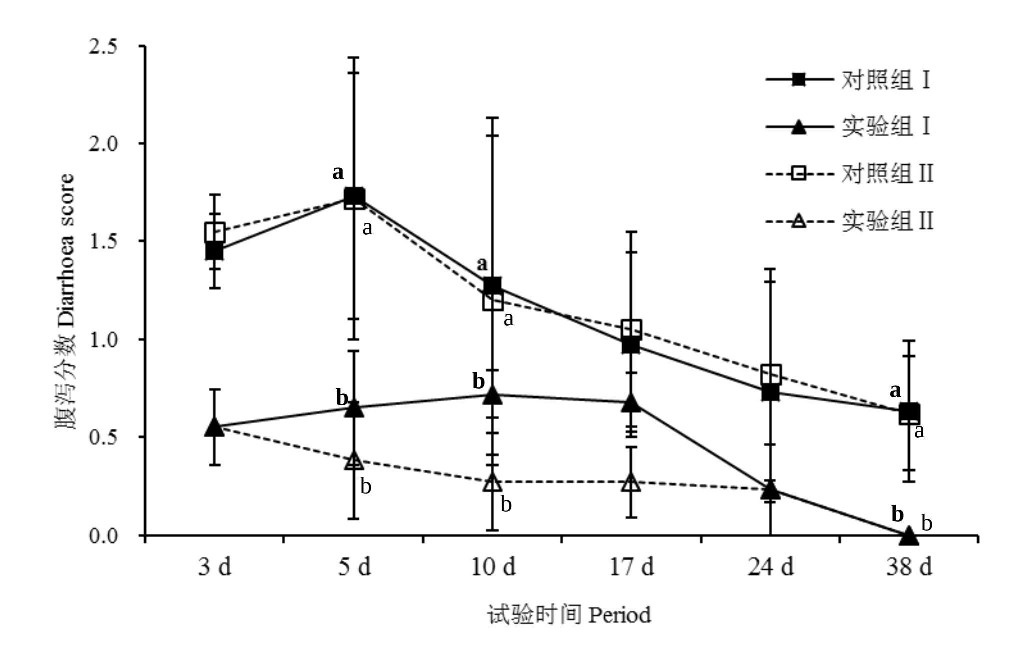


图 1　2 批试验断奶仔猪的活跃分数

Fig.1　Activity score of weaned piglets in two batch tests

2.2　屎肠球菌 WEI-10 对断奶仔猪腹泻分数的影响

2 个批次试验的腹泻分数如图 2 所示，试验组和对照组均在试验第 5、10 和 38 天腹泻分数有显著性差异（*P*<0.05）；饲喂全期，2 批试验均是试验组的腹泻分数低于对照组，并且在试验第 38 天时，2 批试验的试验组的腹泻分数降为 0，对照组腹泻分数在 0.6 左右，因此，即使选择日常添加量 10 倍和 100 倍的剂量饲喂屎肠球菌 WEI-10 也没有引起断奶仔猪腹泻，同时还降低了断奶仔猪的腹泻分数。



同一批试验、同一时间点，试验组和对照组的数据无字母标注表示差异不显著（*P*>0.05），标注不同

小写字母表示差异显著（*P*<0.05）。

In the same batch test and at the same time point, values of test group and control group with no letter mean no significant difference (*P*>0.05), while with different small letters mean significant difference (*P*<0.05).

图 2　屎肠球菌 WEI-10 对断奶仔猪腹泻分数的影响

Fig.2　Effects of *Enterococcus faecium* WEI-10 on diarrhea score of weaned piglets

2.3　屎肠球菌 WEI-10 对断奶仔猪生长性能的影响

饲粮中添加菌株 WEI-10 对断奶仔猪生长性能的影响见表 2，第 1 批试验，试验组Ⅰ的平均日采食量比对照组Ⅰ降低 1.60%，平均日增重降低 3.13%，料重比增加 1.58%，2 组间均无显著性差异（*P*>0.05）。第 2 批试验，试验组Ⅱ的平均日采食量比对照组Ⅱ降低 4.44%，平均日增重降低 2.31%，料重比降低 1.78%，2 组间均无显著性差异（*P*>0.05）。

表 2　屎肠球菌 WEI-10 对断奶仔猪生长性能的影响

Table 2　Effects of *Enterococcus faecium* WEI-10 on growth performance of weaned piglets

批次 Batches	项目 Items	始重 Initial weight/kg	末重 Final weight/kg	平均日增重 ADG/g	平均日采食量 ADFI/g	料重比 F/G
1	试验组Ⅰ Test group Ⅰ	7.374±1.182	23.281±2.166	418.61±29.38	698.24±32.22	1.668±0.256
	对照组Ⅰ Control group Ⅰ	7.500±0.857	23.921±2.280	432.13±37.87	709.56±26.94	1.642±0.130
2	试验组Ⅱ Test group Ⅱ	8.352±1.448	25.73±3.442	457.32±55.03	728.05±54.03	1.601±0.105
	对照组Ⅱ Control group Ⅱ	7.868±1.575	25.658±2.841	468.15±37.77	761.85±46.26	1.630±0.070

同一批试验、同列数据肩标无字母表示差异不显著（*P*>0.05），不同小写字母表示差异显著（*P*<0.05）。下表同。

In the same batch test, values in the same column with no letter superscripts mean no significant difference (*P*>0.05), while with different small letter superscripts mean significant difference (*P*<0.05). The same as below.

2.4　断奶仔猪的菌血症检测结果

平板培养结果显示，第 1、10、24 和 38 天的血液样品培养后均没有菌落长出，结果均为阴性，表明菌株 WEI-10 没有发生易位。

2.5　屎肠球菌 WEI-10 对断奶仔猪脏器指数和重要组织病理变化的影响

解剖时通过临床观察，2 批试验的试验组和对照组仔猪均没有出现肝脏肿大、脾脏肿大和盲肠扩大。内脏器官的脏器指数见表 3，2 批试验的试验组和对照组均没有显著性差异（*P*>0.05）。

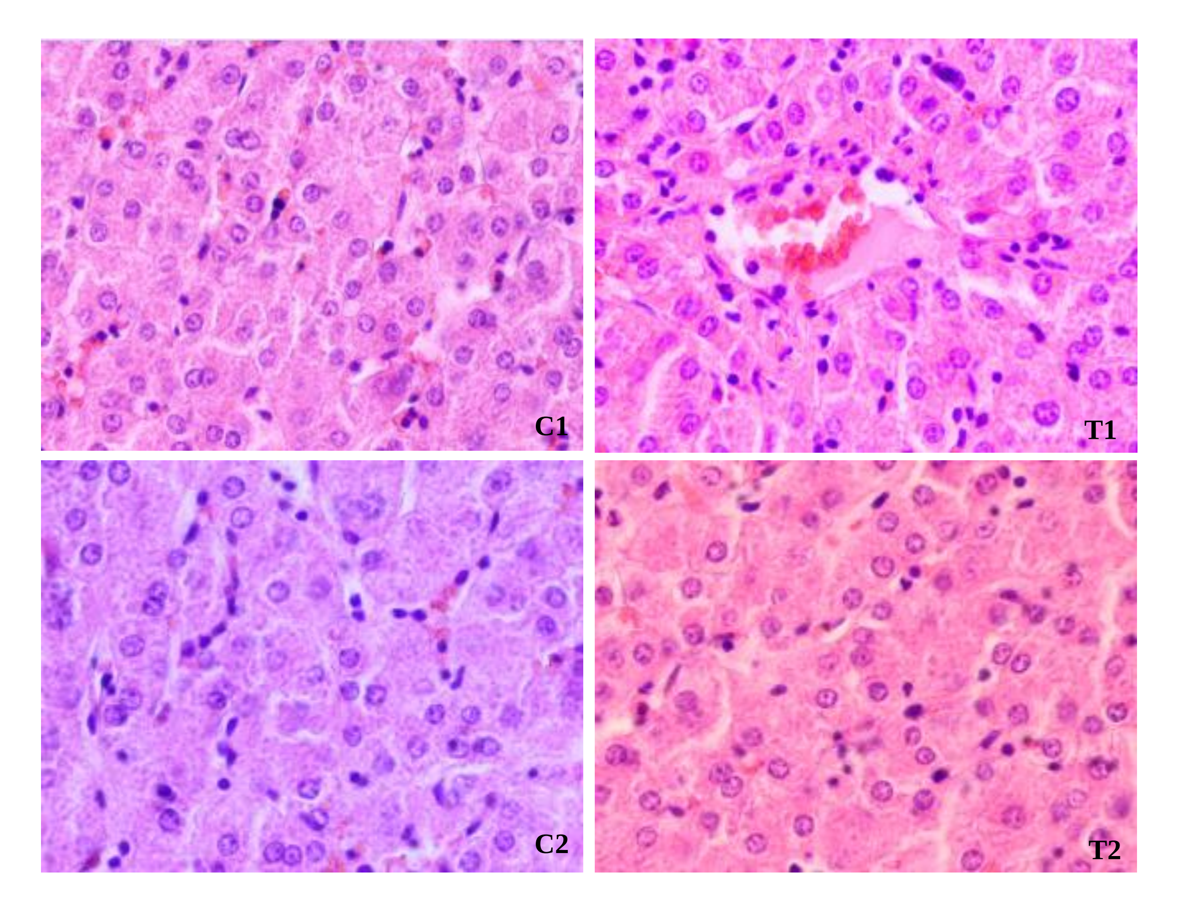
通过组织病理切片分析，2 批试验的试验组和对照组都没有出现脏器实质性病变、炎性

细胞和相应淋巴细胞的增多以及结构疏松和水肿等。饲喂菌株 WEI-10 对仔猪的十二指肠和空肠的肠道黏膜的完整性没有受到影响，也没有造成黏膜上皮细胞脱落、固有层裸露，固有层疏松，以及淋巴细胞浸润造成炎性反应等。以肝脏、脾脏和十二指肠为例，具体分析 2 批试验的试验组和对照组的切片病理结果。2 批试验的肝脏、脾脏和十二指肠的切片病理变化如图 3、4 和 5 所示。由图 3 可以看出，对照组和试验组仔猪肝脏组织正常，肝小叶结构可辨，肝索排列整齐，没有出现肝细胞空泡化、肝窦扩张以及淋巴细胞或炎性细胞浸润等病理特征。由图 4 可以看出，对照组和试验组仔猪脾脏组织正常，白髓和红髓见的边缘带明显，白髓部未发生出血，红髓部脾索清晰，脾血窦未出现扩张等病理特征。由图 5 可以看出，对照组和试验组仔猪十二指肠未出现黏膜上皮细胞脱落、固有层裸露、水肿、固有层和黏膜肌层与黏膜下层间疏松，也未出现嗜酸性粒细胞和浆细胞浸润等病理特征。

表 3　屎肠球菌 WEI-10 对断奶仔猪脏器指数的影响

Table 3　Effects of *Enterococcus faecium* WEI-10 on organ indexes of weaned piglets　　g/kg

批次 Batches	项目 Items	心脏 Heart	肝脏 Liver	脾脏 Spleen	肺脏 Lungs	肾脏 Kidney
1	试验组Ⅰ Test group Ⅰ	5.801±0.854	31.436±2.116	2.873±0.512	14.033±1.229	4.254±0.742
	对照组Ⅰ Control group Ⅰ	5.630±1.008	29.019±3.458	3.308±0.347	17.411±2.057	4.701±0.428
2	试验组Ⅱ Test group Ⅱ	5.096±1.216	26.206±2.587	1.774±0.463	13.194±2.756	4.186±0.543
	对照组Ⅱ Control group Ⅱ	5.686±0.975	26.721±3.074	2.950±0.556	13.125±1.423	6.114±0.821



C1：对照组Ⅰ；T1：试验组Ⅰ；C2：对照组Ⅱ；T2：试验组Ⅱ。下图同。

C1: control group Ⅰ; T1: test group Ⅰ; C2: control group Ⅱ; T2: test group Ⅱ. The same as below.

图 3　尿肠球菌 WEI-10 对断奶仔猪肝脏组织病理变化的影响

Fig.3　Effects of *Enterococcus faecium* WEI-10 on liver histopathological changes of weaned piglets (400 ×)

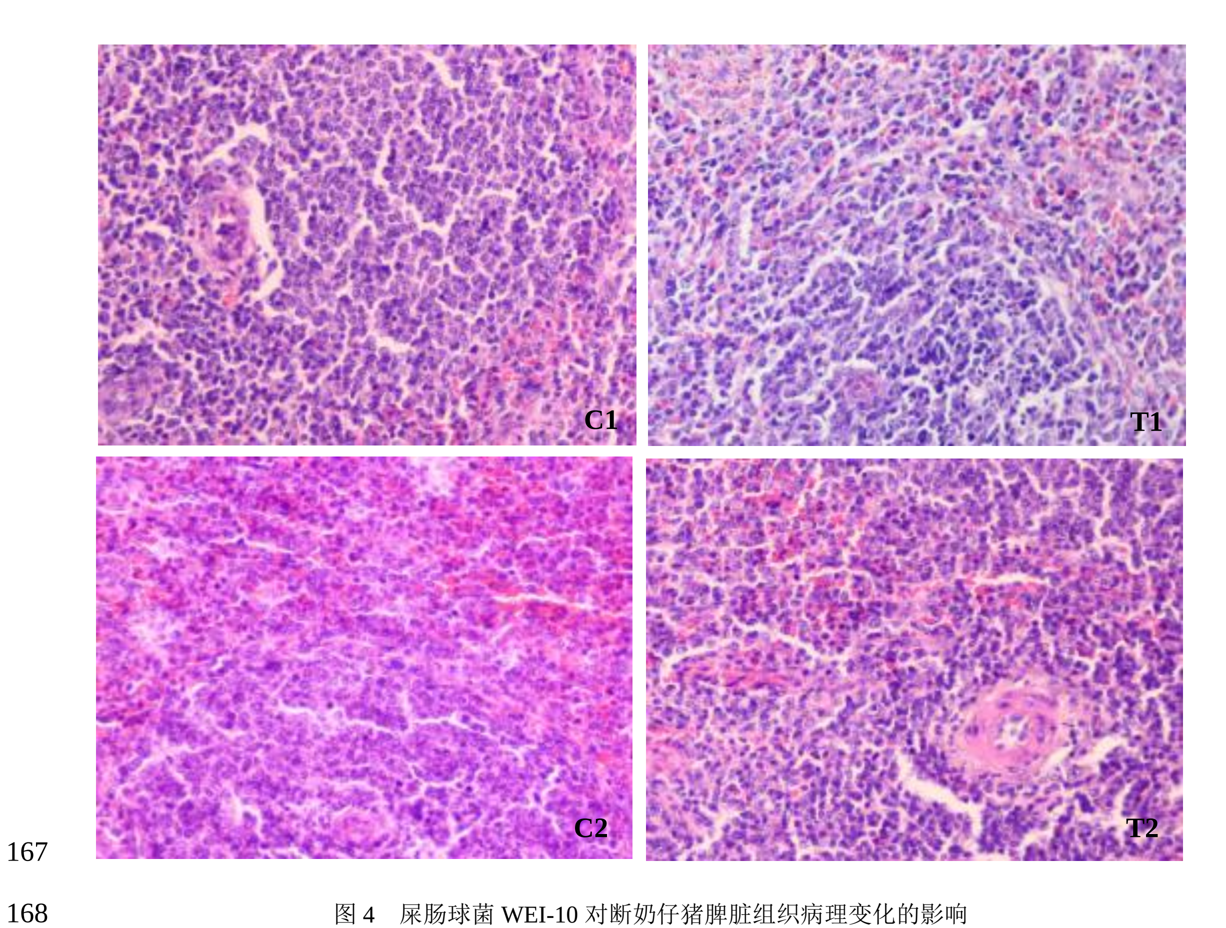


图 4　尿肠球菌 WEI-10 对断奶仔猪脾脏组织病理变化的影响

Fig.4　Effect of *Enterococcus faecium* WEI-10 on spleen histopathological changes of weaned piglets (400 ×)

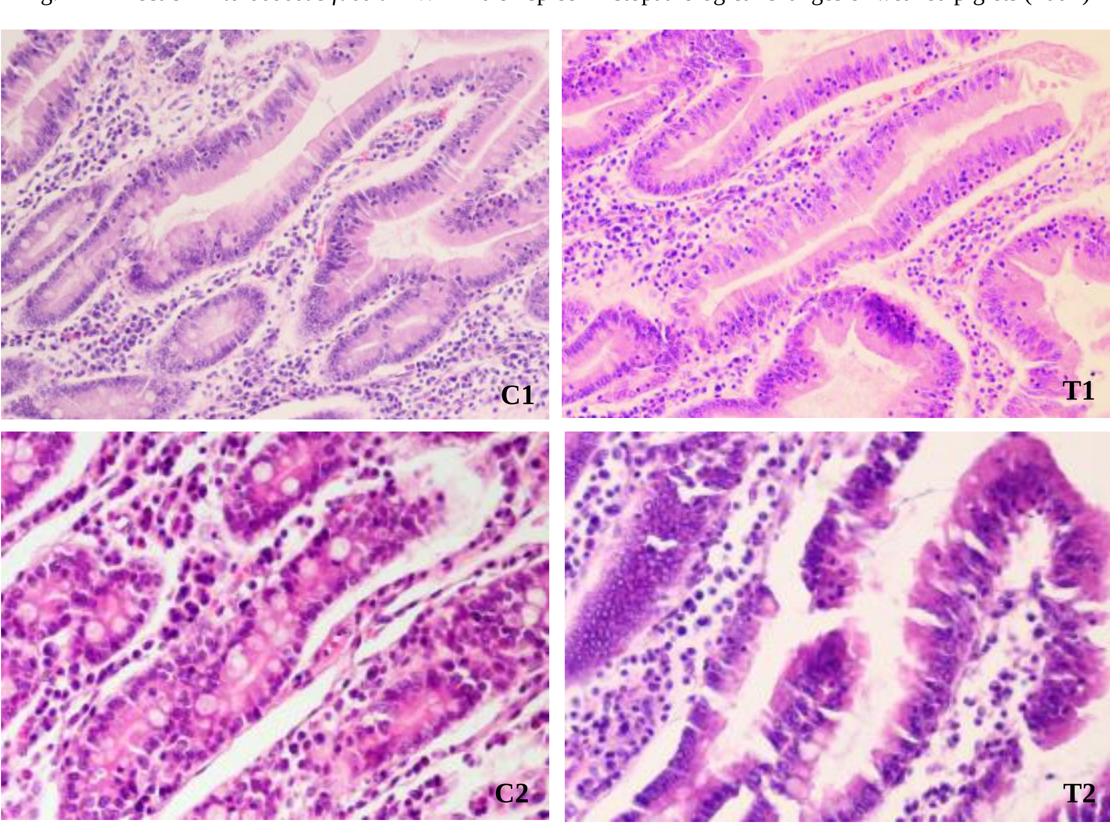


图 5 屎肠球菌 WEI-10 对断奶仔猪十二指肠组织病理变化的影响

Fig.5 Effect of *Enterococcus faecium* WEI-10 on duodenum histopathological changes of weaned piglets (400×)

3 讨 论

目前研究者对屎肠球菌在断奶仔猪上的评价研究多集中在有效性评价，测定的指标主要是生长性能[16-19]、腹泻率[17]、饲粮养分表观消化率[17]、各肠段及粪样 pH 与微生物菌群[17,20-21]、血液生化指标[16-18]、免疫能力[18,21]、小肠绒毛发育及养分吸收和抗病原菌感染[19,21]等，并且饲喂的剂量大多数是每克基础饲粮添加 10^6 CFU 的活性屎肠球菌，而对屎肠球菌的安全性评价研究主要通过体外试验，如溶血性、毒力基因、抗生素抗性和产有毒代谢产物等。但是，很多情况下体外安全性评价的结果往往不能真实反映其体内的效果，而目前对体内的安全性评价的研究很少且不系统，因此，本研究选择的饲喂剂量是日常添加量（每克基础饲粮添加 10^6 CFU 益生菌）的 10 倍和 100 倍，即每克基础饲粮添加 1×10^7 CFU 和 1×10^8 CFU 菌株 WEI-10，研究屎肠球菌对断奶仔猪的安全性。

3.1 屎肠球菌 WEI-10 对断奶仔猪整体活跃状态、腹泻分数和生长性能的影响

食欲、活跃状态、腹泻状况和生长性能是反映动物健康状态的敏感性指标，本研究以动物的平均日采食量、平均日增重、料重比、活跃分数和腹泻分数为指标研究屎肠球菌 WEI-10 针对断奶仔猪的体内安全性评价。本研究选择的饲喂剂量是每克基础饲粮添加 1×10^7 CFU 和 1×10^8 CFU 菌株 WEI-10（饲喂剂量为日常添加量的 10 倍和 100 倍），尽管 2 批试验的试验组的平均日采食量和平局日增重均略低于对照组，且第 1 批试验的试验组的料重比也比其相应的对照组略高，但 2 批试验的试验组和对照组均无显著性差异，因此，初步判断，菌株 WEI-10 对没有威胁断奶仔猪的健康。Hanczakowska 等[19]在研究**屎肠球菌** NCIMB 10415 对 26~56 日龄仔猪生长性能的影响时，也得出相似的结果，即饲喂**屎肠球菌** NCIMB 10415 的试验组的平均日采食量和平均日增重均低于对照组，料重比也高于对照组，但组间无显著性差异。Zhou 等[4]在对鼠李糖乳杆菌 HN001、嗜酸乳杆菌 HN017 和双歧杆菌 HN019 进行毒性评价时，结果表明鼠李糖乳杆菌 HN001、嗜酸乳杆菌 HN017 和双歧杆菌 HN019 与对照组及商业化的菌株鼠李糖乳杆菌 GG 和嗜酸乳杆菌 LA-1 相比，活跃分数均没有显著性差异。本研究 2 批试验的试验组与对照组相比，均降低了腹泻分数。这与很多前人的研究结果相似，

如 Chen 等[22]报道在饲粮中添加益生菌可降低猪排泄物中氨的浓度，从而降低腹泻分数；同样，Thu 等[23]报道在断奶仔猪的饲粮中按照 3%的量添加植物乳杆菌的液体代谢物，可以显著降低断奶仔猪的腹泻分数。华均超等[17]报道在断奶仔猪饲粮中按照 6%的量添加屎肠球菌 T013 复合制剂能显著降低腹泻率。

3.2 断奶仔猪的菌血症检测结果

细菌易位或菌血症是大部分的肠道条件致病菌发病的先决条件，也是反映细菌的感染能力和致病性的重要指标[24]。本研究未在血液中检测到菌株 WEI-10，因此，菌株 WEI-10 没有从肠道易位至全身的血液组织，不存在易位的风险。Zhou 等[4]在研究鼠李糖乳杆菌 HN001、嗜酸乳杆菌 HN017 和双歧杆菌 HN019 的毒性评价时也得出同样结论。因此，认为菌株 WEI-10 没有侵入性，对仔猪是安全的。

3.3 屎肠球菌 WEI-10 对断奶仔猪脏器指数和重要组织病理变化的影响

感染性和致病性也是益生菌安全性评价的重要指标。肝脏肿大和脾脏肿大是反映感染性的间接指标，通过解剖临床观察 2 批试验的试验组和对照组的肝脏、脾脏和其他脏器均没有出现实质性病变和明显差异，并且进一步测定的脏器指数也说明试验组和对照组之间无显著性差异。外周血嗜中性粒细胞或嗜酸性粒细胞是反映细菌感染的有效指标，通过组织切片病理分析，没有观察到试验组的脏器实质性病变、炎性细胞和相应淋巴细胞的增多以及结构疏松和水肿等，并且和对照组之间无明显病理差异，说明菌株 WEI-10 没有引起仔猪感染和致病。肠道黏膜在阻止潜在致病菌或有毒物质侵袭全身组织上发挥重要的屏障作用[8]。本研究的菌株 WEI-10 对试验组仔猪的十二指肠和空肠的肠道黏膜的完整性没有不良影响，不会造成黏膜上皮细胞脱落、固有层裸露，固有层疏松，以及淋巴细胞浸润造成炎性反应等，因此说明菌株 WEI-10 没有感染性和致病性。Giannenas 等[21]在研究屎肠球菌对育肥猪的肠道黏膜影响的毒性评价时也得出相似的结论。

4 结 论

①即使选择饲喂剂量为日常添加量的 10 倍和 100 倍，屎肠球菌 WEI-10 饲喂断奶仔猪后各项指标（活跃分数、腹泻分数、平均日采食量、平均日增重和料重比）尽管略有变差，但均无显著性变化。

②屎肠球菌 WEI-10 没造成在断奶仔猪肠道外组织的易位，也未造成内脏和肠道黏膜的

组织性病变。

③屎肠球菌 WEI-10 不存在安全性问题。

参考文献：

[1] SÁNCHEZ-SILOS R M,PÉREZ-GIRALDO C,MARTÍN P,et al.Pathogenicity of Enterococcus spp. Characteristics of 169 hospital isolates[J].Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica,2000,18(4):165–169.

[2] DONOHUE D C,SALMINEN S,MARTEAU P.Safety of probiotic bacteria[M]//SALMINEN S,VON WRIGHT A.Lactic acid bacteria.New York:Marcel Dekker,1998:369.

[3] ENDRES J R,CLEWELL A,JADE K A,et al.Safety assessment of a proprietary preparation of a novel Probiotic,*Bacillus coagulans*,as a food ingredient[J].Food and Chemical Toxicology,2009,47(6):1231–1238.

[4] ZHOU J S,SHU Q,RUTHERFURD K J,et al.Safety assessment of potential probiotic lactic acid bacterial strains *Lactobacillus rhamnosus* HN001,*Lb.acidophilus* HN017,and *Bifidobacterium lactis* HN019 in BALB/c mice[J].International Journal of Food Microbiology,2000,56(1):87–96.

[5] ZHOU J S,SHU Q,RUTHERFURD K J,et al.Acute oral toxicity and bacterial translocation studies on potentially probiotic strains of lactic acid bacteria[J].Food and Chemical Toxicology,2000,38(2/3):153–161.

[6] MATTILA-SANDHOLM T.The PROBDEMO project:demonstration of the nutritional functionality of probiotic foods[J].Trends in Food Science & Technology,1999,10(12):385–386.

[7] FRIZZO L S,BERTOZZI E,SOTO L P,et al.Studies on translocation,acute oral toxicity and intestinal colonization of potentially probiotic lactic acid bacteria administered during calf rearing[J].Livestock Science,2010,128(1/2/3):28–35.

[8] MA L,DEITCH E,SPECIAN R,et al.Translocation of *Lactobacillus murinus* from the gastrointestinal tract[J].Current Microbiology,1990,20(3):177–184.

[9] LIU X T,WANG Y,WANG H L,et al.Effect of a liquid culture of *Enterococcus faecalis*

CGMCC1.101 cultivated by a high density process on the performance of weaned piglets[J].Livestock Science,2014,170:100–107.

[10] 王杰,艾萍萍,刁其玉,等.复合益生菌和纤维寡糖对断奶仔猪生长性能、粪便微生物及血清指标的影响[J].动物营养学报,2016,28(3):881–890.

[11] FENG Y Y,QIAO L,LIU R,et al.Potential probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from the intestinal mucosa of healthy piglets[J].Annals of Microbiology,2017,67(3):239–253.

[12] FEEDAP.Guidance on the safety assessment of *Enterococcus faecium* in animal nutrition[J].EFSA Journal,2012,10(5):2682.

[13] NRC.Nutrient requirements of swine[S].11th ed.Washington,D.C.:National Academy Press,2012.

[14] LOH T C,CHOO P Y,CHEONG Y H.Effects of organic acids and natural herbs on performance and incidence of diarrhoea in post-weaning pigs[J].Malaysian Journal of Animal Science,2002,7(2):25–30.

[15] DOWARAH R,VERMA A K,AGARWAL N,et al.Effect of swine based probiotic on performance,diarrhoea scores,intestinal microbiota and gut health of grower-finisher crossbred pigs[J].Livestock Science,2016,195:74–79.

[16] 文静,孙建安,周绪霞,等.屎肠球菌对仔猪生长性能、免疫和抗氧化功能的影响[J].浙江农业学报,2011,23(1):70–73.

[17] 华均超,张邦辉,周明,等.屎肠球菌 T013 复合制剂在断奶仔猪生产中的应用研究[J].安徽农业科学,2012,40(11):6519–6523.

[18] 王永,杨维仁,张桂国.饲粮中添加屎肠球菌对断奶仔猪生长性能、肠道菌群和免疫功能的影响[J].动物营养学报,2013,25(5):1069–1076.

[19] HANCZAKOWSKA E,ŚWIĄTKIEWICZ M,NATONEK-WIŚNIEWSKA M,et al.Medium chain fatty acids (MCFA) and/or probiotic *Enterococcus faecium* as a feed supplement for piglets[J].Livestock Science,2016,192:1–7.

[20] PAJARILLO E A B,CHAE J P,BALOLONG M P,et al.Effects of probiotic *Enterococcus faecium* NCIMB 11181 administration on swine fecal microbiota diversity and composition

using barcoded pyrosequencing[J].Animal Feed Science and Technology,2015,201:80–88.

[21] GIANNENAS I,DOUKAS D,KARAMOUTSIOS A,et al.Effects of *Enterococcus faecium*,mannan oligosaccharide,benzoic acid and their mixture on growth performance,intestinal microbiota,intestinal morphology and blood lymphocyte subpopulations of fattening pigs[J].Animal Feed Science and Technology,2016,220:159–167.

[22] CHEN Y J,SON K S,MIN B J,et al.Effects of dietary probiotic on growth performance,nutrients digestibility,blood characteristics and fecal noxious gas content in growing pigs[J].Asian-Australasian Journal of Animal Sciences,2006,18(10):1464–1468.

[23] THU T V,LOH T C,FOO H L,et al.Effects of liquid metabolite combinations produced by *Lactobacillus plantarum* on growth performance,faeces characteristics,intestinal morphology and diarrhoea incidence in postweaning piglets[J].Tropical Animal Health and Production,2011,43(1):69–75.

[24] FORD H R,AVANOĞLU A,BOECHAT P R,et al.The microenvironment influences the pattern of bacterial translocation in formula-fed neonates[J].Journal of Pediatric Surgery,1996,31(4):486–489.

Safety Evaluation of *Enterococcus faecium* WEI-10 on Weaned Piglets

FENG Yuanyuan QIAO Lin* YAO Hongming JIE Linxia GAO Changbin LIU Rui

（*Beijing Daweijia Biotechnology Co., Ltd., Beijing Engineering Laboratory of Probiotics Key Technology Development, Beijing Engineering and Technology Research Center of Feeding Probiotics, Beijing* 100085, *China*）

Abstract: In order to evaluate the safety of study *Enterococcus faecium* WEI-10 on weaned piglets，*Enterococcus faecium* WEI-10 was added in diet to determine the effects on activity condition, diarrhea score, growth performance, histopathology changes and bacteremia in weaned piglets. Two batch tests were designed. In each batch test, two hundred and fifty-three crossbred (large white×Landrace×Duroc) weaned piglets at 26 days of age with average body weight of (7.44±1.02)

*Corresponding author, E-mail: linandqiao@aliyun.com (责任编辑 王智航)

kg and (8.11±1.51) kg, respectively, were randomly assigned to two groups. Control group was fed only with a basal diet without antibiotics and probiotics, and test group was fed the basal diet supplemented with *Enterococcus faecium* WEI-10 （1×10^8 CFU and 1×10^7 CFU *Enterococcus faecium* WEI-10 per gram of basal diet in two batch tests, respectively）. The trial lasted for 38 days. The results showed as follows: 1) there were no significant differences between test group and control group in activity score, average daily gain and feed to gain ratio in two batch tests ($P>0.05$). 2) Compared with control groups, diarrhea score of test groups on day 5, 10 and 38 was significantly decreased（$P<0.05$）; on day 38, diarrhea score of test groups reduced to 0, while that of control groups was about 0.6. 3）Bacteremia and pathology changes in heart, liver, spleen, lung, kidney, duodenum and jejunum did not occurre in test groups and control groups of two batch tests. The study indicates that *Enterococcus faecium* WEI-10 has no safety problems and can reduce diarrhea of weaned piglets.

Key words: *Enterococcus faeciums*; weaned piglets; safety; growth performance; bacteremia; histopathology